

Reference B03

Appl. No. 09/090,754
Attorney Docket No. 8449-041-999

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-501520

(43) 公表日 平成10年(1998) 2月10日

(51) IntCl ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 39/00		9455-4C	A 6 1 K 39/00	A
39/002		9455-4C	39/002	
39/02		9455-4C	39/02	
39/118		9455-4C	39/118	
39/12		9455-4C	39/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-524187
(86) (22) 出願日 平成7年(1995) 3月16日
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996) 9月17日
(86) 国際出願番号 PCT/US 95/03311
(87) 国際公開番号 WO 95/24923
(87) 国際公開日 平成7年(1995) 9月21日
(31) 優先権主張番号 210, 421
(32) 優先日 1994年3月16日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 マウント シナイ スクール オブ メデ
イシン オブ ザ シティ ユニバーシ
ティー オブ ニューヨーク
アメリカ合衆国 10029 ニューヨーク州
ニューヨーク, ガスティブ エル. レヴ
イー プレイス 1 番地
(72) 発明者 スリヴァスタヴァ, プラモッド ケイ.
アメリカ合衆国 10128 ニューヨーク州
ニューヨーク, イースト 49 ティーエイ
チストリート 27 番地, アパートメント
3 イー
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内病原体に対する予防・治療用ワクチンとしてのストレスタンパク質-ペプチド複合体

(57) 【要約】

哺乳動物に投与したとき、予め選ばれた細胞内病原体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を哺乳動物の体内で開始させるように働くストレスタンパク質-ペプチド複合体を含有するワクチンの一ファミリーが記載される。また、このようなストレスタンパク質-ペプチド複合体を含有するワクチンの調製方法および投与方法も記載される。

【特許請求の範囲】

1. 哺乳動物において、予め選ばれた細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を誘導するための、哺乳動物投与用のワクチンであって、

(a) 該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体に感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドと、ストレスタンパク質とを複合体化させてなる、該哺乳動物の体内で該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるように働く免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体、および

(b) 製剤学的に許容されるキャリアー

を含んでなるワクチン。

2. 哺乳動物において、予め選ばれた細胞内病原体の感染に対する抵抗性を引き出すための、哺乳動物投与用のワクチンであって、

(a) 該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体に感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドと、ストレスタンパク質とを複合体化させてなる、該哺乳動物の体内で該病原体感染に対する抵抗性を、哺乳動物の細胞障害性T細胞応答によって、引き出すように働く免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体、および

(b) 製剤学的に許容されるキャリアー

を含んでなるワクチン。

3. 前記のストレスタンパク質がH s p 6 0、H s p 7 0およびH s p 9 0よりなる群から選ばれるストレスタンパク質ファミリーのメンバーである、請求項1または2に記載の組成物。

4. 前記のストレスタンパク質がg p 9 6である、請求項1または2に記載の組成物。

5. サイトカインをさらに含む、請求項1または2に記載の組成物。

6. 前記のサイトカインがI L-1 α 、I L-1 β 、I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-9、I L-10、I L-11、I L-12、I F N α 、I F N β 、I F N γ 、T N F α 、T N F β 、G-

CSF、GM-CSFおよびTGF- β よりなる群から選ばれる、請求項5に記載の組成物。

7. 前記の真核細胞が不死化された真核細胞である、請求項1または2に記載の組成物。

8. 前記の哺乳動物がヒトである、請求項1または2に記載の組成物。

9. 前記の病原体がウイルスである、請求項1または2に記載の組成物。

10. 前記のウイルスがA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純ヘルペスI型、単純ヘルペスII型、牛痘、リノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、RS(respiratory syncytial)ウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス(huntavirus)、コクサッキーウイルス、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型およびヒト免疫不全ウイルスII型よりなる群から選ばれる、請求項9に記載の組成物。

11. 前記の病原体がバクテリアである、請求項1または2に記載の組成物。

12. 前記のバクテリアがマイコバクテリア属、リケッチア属、ナイセリア属およびレジオネラ属よりなる群から選ばれる、請求項11に記載の組成物。

13. 前記の病原体が原虫である、請求項1または2に記載の組成物。

14. 前記の原虫がリーシュマニア属、トリパノソーマ属およびコクジジオア(Kozidiao)属よりなる群から選ばれる、請求項13に記載の組成物。

15. 前記の病原体が細胞内寄生体である、請求項1または2に記載の組成物。

16. 前記の寄生体がクラミジア属およびリケッチア属よりなる群から選ばれる、請求項15に記載の組成物。

17. 前記のペプチドがストレスタンパク質と非共有結合により複合体化されている、請求項1または2に記載の組成物。

18. 哺乳動物の疾病の原因となる予め選ばれた細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を哺乳動物において誘導する方法であって、

該哺乳動物に、

(a) 該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体

に

感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドとストレスタンパク質とを複合体化させてなる、該哺乳動物の体内で該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるように働く免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体、および

(b) 製剤学的に許容されるキャリアー

を含んでなるワクチンを、該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を該哺乳動物において誘導するのに十分な量で投与することからなる方法。

19. 哺乳動物の疾病の原因となる予め選ばれた細胞内病原体の感染に対する抵抗性を哺乳動物において引き出す方法であって、

該哺乳動物に、

(a) 該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体に感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドとストレスタンパク質とを複合体化させてなる、該哺乳動物の体内で該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるように働く免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体、および

(b) 製剤学的に許容されるキャリアー

を含んでなるワクチンを、該病原体感染に対する抵抗性を細胞障害性T細胞応答によって該哺乳動物において引き出すのに十分な量で投与することからなる方法。

20. 前記の細胞障害性T細胞応答がクラス I 主要組織適合遺伝子複合体により媒介される、請求項18または19に記載の方法。

21. 前記のストレスタンパク質がH s p 6 0、H s p 7 0およびH s p 9 0よりなる群から選ばれるストレスタンパク質ファミリーのメンバーである、請求項18または19に記載の方法。

22. 前記のストレスタンパク質がg p 9 6である、請求項18または19に記載の方法。

23. 前記の組成物がサイトカインをさらに含む、請求項18または19に記載の方法

- 。
24. 前記のサイトカインがIL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TNF β 、G-CSF、GM-CSFおよびTGF- β よりなる群から選ばれる、請求項23に記載の方法。
25. 前記の真核細胞が不死化された真核細胞である、請求項18または19に記載の方法。
26. 前記の哺乳動物がヒトである、請求項18または19に記載の方法。
27. 哺乳動物への前記病原体による今後の感染を防止するための細胞障害性T細胞応答を該哺乳動物において刺激するために、前記のワクチンを予防的に該哺乳動物に投与する、請求項18または19に記載の方法。
28. 哺乳動物に感染している前記病原体に対する細胞障害性T細胞応答を該哺乳動物において刺激するために、前記のワクチンを治療的に該哺乳動物に投与する、請求項18または19に記載の方法。
29. 前記のワクチンを1回の免疫感作につき約0.1～1000 μ g（複合体）/kg（哺乳動物の体重）の範囲で哺乳動物に投与する、請求項18または19に記載の方法。
30. 前記の量が1回の免疫感作につき約0.5～100 μ g（複合体）/kg（哺乳動物の体重）の範囲である、請求項29に記載の方法。
31. 哺乳動物において予め選ばれた細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を誘導するためのワクチンの調製方法であって、

(a) 該病原体に感染した真核細胞から免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体を単離し、

ここで該複合体は、該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体に感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドとストレスタンパク質との複合体であって、哺乳動物に投与したとき、哺乳動物の体内で該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるように働くものであり、

そして

(b) 該複合体を製剤学的に許容されるキャリアーと組み合わせる

ことを含んでなる方法。

32. 哺乳動物において予め選ばれた細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答

を誘導するためのワクチンの調製方法であって、

(a) 該病原体に感染した真核細胞中に存在するが、該細胞が該病原体に感染していないときには該細胞中に存在しないペプチドとストレスタンパク質とを *in vitro* で再構成させ、それにより、哺乳動物に投与したとき、哺乳動物の体内で該病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるように働くストレスタンパク質-ペプチド複合体を形成し、そして

(b) 該複合体を製剤学的に許容されるキャリアーと組み合わせる

ことを含んでなる方法。

33. 再構成に先立って前記のストレスタンパク質をATPの存在下で単離する、請求項32に記載の方法。

34. 再構成に先立って前記のストレスタンパク質を低pHで処理する、請求項32に記載の方法。

35. 前記のストレスタンパク質がHsp60、Hsp70およびHsp90よりなる群から選ばれるストレスタンパク質ファミリーのメンバーである、請求項31または32に記載の方法。

36. 前記のストレスタンパク質がgp96である、請求項31または32に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

細胞内病原体に対する予防・治療用ワクチンとしての

ストレスタンパク質-ペプチド複合体

発明の分野

本発明は一般にワクチン開発の分野に関する。さらに特定すると、本発明は細胞内病原体に対して有効な予防および治療用ワクチンの開発に関する。

発明の背景

細胞内病原体、例えばウイルス、バクテリア、原虫、真菌、細胞内寄生体などに対するワクチンの開発は進歩しつつある。ヒトの疾病の広がり防止するのに、ワクチンの開発と使用は非常に有効であることが証明されている。例えば、1967年には天然痘は33ヵ国において発生していた風土病で、毎年1000万～1500万の症例が報告されていた。その当時、世界保健機構（WHO）は天然痘を根絶する計画を打ち出した。そしておよそ10年後にヒト集団からの天然痘の撲滅は成功を収めたのだった。

理論的に、理想的なワクチンとは、長い貯蔵寿命を有し、1回の投与で所定の病原体とその全ての表現型変異体に対して持続性の免疫を誘導することができ、ワクチンが対象としている疾病を引き起こさず、治療的にも予防的にも有効であり、標準的な方法を用いて簡単かつ経済的に調製することができ、さらにその分野で容易に投与し得るものである。

現在、哺乳動物の疾病に対して主に4種類のワクチンが開発されている。それらには弱毒生ワクチン、非生完全ワクチン、ベクターワクチン、そしてサブユニットワクチンが含まれる。いくつかの文献にはこうした種類のワクチンの調製法および効能が論じられている。例えば、Subbaraoら、(1992) in Genetically Engineered Vaccines, Ciardiら編, Plenum Press, New YorkおよびMelnick (1985) in High Technology Route to Virus Vaccines, Dreesmanら編, American Society for Microbiology発行を参照されたい（これらの開示内容を

参考としてここに組み入れる）。4種類のワクチンのそれぞれの長所と短所を以下に要約する。

弱毒生ワクチンは、生きているが弱毒化された病原体、すなわち遺伝的突然変異によって「毒力を弱められた」非感染性の病原体を含む。こうした突然変異はレシピエントつまりワクチン接種を受けた人が病原体により発病するのを妨げる。このタイプのワクチンの主な長所は、弱毒生物が自然感染をまねることによって野生型病原体と同様にレシピエントの免疫系を刺激することである。さらに、弱毒病原体はワクチン接種を受けた人の体内で複製し、それによってレシピエントの免疫系に抗原決定基を連続的に供給する。その結果、生ワクチンは野生型病原体に対して強力で持続的な免疫応答を誘導することができる。その上、生ワクチンは病原体を中和する抗体の生産を刺激することもできる。それらはまた、宿主への自然侵入門において病原体に対する抵抗力を引き出すこともできる。これまでに、天然痘、黄熱、麻疹、おたふくかぜ、風疹、ポリオ、アデノウイルスおよび結核に対して弱毒生ワクチンが開発されている。

しかしながら、弱毒生ワクチンはいくつかの固有の問題を抱えている。第一に、弱毒病原体は毒性表現型に復帰する危険が常に存在している。表現型復帰の場合には、ワクチンが実際に疾病（この疾病に対する免疫を賦与するようにワクチンを設計してある）を引き起こすかもしれない。第二に、抗原決定基を絶えず変化させる病原体に対して生ワクチンを開発することは費用がかかり、实际的でない。例えば、研究者らはインフルエンザウイルスに対する実用的な生ワクチンを開発することができなかった。と言うのは、このウイルスがそのコートタンパク質の抗原決定基を変化し続けるからである。第三に、レトロウイルスやトランスフォーミングウイルスによって引き起こされる感染症に対する弱毒生ワクチンを開発することができない。これらのウイルスに由来する核酸はレシピエントのゲノムに組み込まれて、がんを誘発する危険がある。第四に、弱毒生ワクチンの製造中に、ワクチン製造用のセル中に存在する外因性物質が弱毒病原体と一緒に精製される可能性がある。これまでにワクチン製造中に検出された外来ウイルスとして、トリ白血症ウイルス、サル・パポバウイルスSV40、サル・サイトメガロウイルスが挙げられる。第五に、生ワクチン製剤は不安定であり、それゆえ、その分

野でのそれらの貯蔵および使用が制限される。目下、有効ワクチンの貯蔵寿命を長引かせる安定剤の開発が進行中である。

非生完全ワクチン(non living whole vaccine)は生存能のない生物全体を含むものである。一般的には、病原体は化学的処理すなわちホルマリン不活化により、または致死量の放射線処理により不活化される。非生完全ワクチンは百日咳、発疹チフス、腸チフス、パラチフスおよび特定のインフルエンザ株に対して開発されている。

基本的に、非生ワクチンは病原体が宿主の体内で病気を引き起こす可能性がないので通常は安全に投与できる。さらに、生物が死滅しているのでワクチンは安定で長い貯蔵寿命をもつ傾向がある。しかし、非生完全ワクチンにはいくつかの欠点がある。第一に、病原体がワクチン中で確実に生き残らないようにするため、ワクチン製造の際に細心の注意を払う必要がある。第二に、このタイプのワクチンは一般に細胞性応答の刺激には効果がなく、細胞内病原体に対して無効となりがちである。第三に、非生ワクチンによって誘起される免疫は通常一時的であって、あとで追加免疫を施さねばならない。この方法はワクチン接種を必要とする人と何度も接触することを必要とし、また、野生型病原体に対して被ワクチン接種者を高感作する心配がある。

ベクターワクチンは、組換えビヒクル生ワクチンとしても知られているもので、対象の特定抗原決定基をコードする遺伝子が無害の生存ウイルスまたはバクテリアに組み込むことにより調製される。その後、無害のベクター生物を予定したレシピエントに注入することになっている。理論的には、組換えベクター生物が宿主内で複製して抗原決定基を産生し、そして宿主の免疫系にその決定基を提示する。このタイプのワクチンは非複製型のワクチンよりも効果的であると考えられる。こうしたワクチンが成功するためには、ベクターが生きていて、しかも自然界で無毒であるか弱毒表現型をもつかのいずれかである必要がある。

現在好適なベクターとしてはワクシニア（牛痘）ウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、サルモネラおよびマイコバクテリアの特定株が含まれる。ワクシニアウイルスとマイコバクテリアの生存株はそれぞれ天然痘ワクチンおよび結核（BCG）ワクチンの形でヒトに安全に投与されてきた。それらは外来タ

ンパク質を発現し、毒性表現型への転換を殆どまたは全く示さないことが判った。現在、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対して、BCGベクターを用いたタイプのベクターワクチンが幾つか開発されつつある。例えば、HIVの抗原タンパク質、すなわちgag、env、HIVプロテアーゼ、逆転写酵素、gp120およびgp41を1度に1つずつBCGベクターに導入したところ、モデル動物においてHIVタンパク質に対するT細胞性免疫応答が誘起されたことが判明した(Aldoviniら(1991)Nature 351:479-482; Stoverら(1991)Nature 351:456-460; Colston(1991)Nature 351:442-443)。

ベクターワクチンは複数の外来遺伝子を運ぶことができ、それによって予め選ばれた多様な抗原決定基に対する同時ワクチン接種を可能にする。例えば、研究者らはいくつかのHIV遺伝子をワクシニアウイルスゲノムに挿入して、理論的には数種のHIVタンパク質に対する応答を同時に刺激しうる多価ワクチンを製造した。

ベクターワクチンにもいくつかの短所がある。第一に、対象遺伝子のキャリアーとして役立つ非病原性生物の適当な生存株を同定する必要がある。第二に、ベクターワクチンの調製は、防御可能な抗原決定基が同定され、特性付けられたときに限られる。従って、抗原決定基がまだ同定されていない病原体や、各変異株の抗原決定基を同定し得ないほど変化しやすい病原体に対してはベクターワクチンを調製することができない。第三に、所定の抗原決定基をコードする遺伝子は好適なキャリアー生物中に安定した状態でトランスフェクトされ、発現されねばならない。その結果として、この種のワクチンの開発には労力と時間がかかる。第四に、組換えベクターワクチンが所定の病原体に対してレシピエントを効率よく免疫するという事は未だに確立されていない。

サブユニットワクチンは一般に対象病原体から精製された細胞下成分を含む。細胞下成分がレシピエントを発病させるとは考えられないので、通常サブユニットワクチンは安全に投与できる。精製された細胞下成分は、病原体に対する免疫反応を促進することができる抗原決定基を有する細胞下成分、精製されたタンパク質、核酸または多糖でありうる。抗原性成分は破砕した病原体の調製物から精製することができる。また、抗原性タンパク質、核酸または多糖は当技術分野で

公知の方法を使って合成することもできる。サブユニット型ワクチンにより処置されてきた疾病としては、コレラ、ジフテリア、B型肝炎、ポリオ、破傷風、特定のインフルエンザ株などがある。

しかしながら、サブユニットワクチンにもいくつかの短所がある。第一に、防御抗原決定基の同定および特性付けを行うことが重要となる。これは労力と時間のかかる方法である。そのため、抗原決定基が非常に変わりやすい病原体に対するサブユニットワクチンを開発することは实际的でない。第二に、サブユニットワクチンは概して細胞障害性T細胞応答の刺激には効果を示さず、従って細胞内病原体に対する免疫応答を増強させることには無効である。第三に、サブユニットワクチンにより誘起された免疫は通常一時的なもので、非生完全ワクチンと同様に、あとで追加免疫を施さねばならず、それゆえ、野生型病原体に対して被ワクチン接種者を高感作する心配が生じる。

かくして、多くの不活化された完全およびサブユニットワクチンは、強い防御免疫反応を単独で引き出すのに十分な免疫原性を持ち合わせていない。その結果として、例えば水酸化アルミニウム、無傷のマイコバクテリアおよび／またはマイコバクテリア成分を含めた免疫刺激剤が、ワクチンにより刺激される免疫応答を増強する目的で、これらのワクチンとともに投与されてきた。最近の研究により、マイコバクテリアの熱ショックタンパク質はペプチドワクチンのキャリアーとして作用し、それによって生体内で該ペプチドの免疫原性を増強することが明らかにされた (Lussowら(1991)Eur. J. Immunol. 21:2297-2302)。別の研究からは、マイコバクテリアの精製ストレスタンパク質に化学的に架橋させた抗原性ペプチドを含む組成物をマウスに投与したところ、その抗原性ペプチドに対する一時的な(細胞媒介性)応答よりもむしろ体液性(抗体媒介性)応答が誘起されることが明らかになった (Barriosら(1992)Eur. J. Immunol. 22:1365-1372)。

しかしながら、一般的に細胞内病原体に対する免疫感作には細胞性応答が必要であると考えられる(例えば、“Advanced Immunology”, Maleら(1991) Gower Medical Publishing; Raychaudhuriら(1993)Immunology Today 14:344-348を参照のこと)ので、通常のサブユニットワクチンおよび不活化完全生物ワクチン

は細胞内病原体に対する免疫応答、特に細胞障害性T細胞応答、を刺激するのに効果的でないと考えられる。

本発明の目的は、細胞障害性T細胞応答によって、所定の細胞内病原体感染に対する抵抗性を誘導することができる、哺乳動物に投与するための、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を含有する安全なサブユニットワクチンを提供することである。本発明により調製されたワクチンは、抗原決定基が同定されているか、まだ同定されていない細胞内病原体、または各抗原決定基を単離して特性付けることが実際的でない細胞内病原体に対する免疫応答を引き出すために用いられる。本発明によるワクチンは所定の病原体に対して予防的にも治療的にも有効である。

本発明のもう一つの目的は、哺乳動物にストレスタンパク質-ペプチドサブユニットワクチンを投与することにより、哺乳動物において細胞内病原体感染に対する抵抗性を誘導する方法を提供することである。他の目的は、細胞内病原体に感染した細胞または細胞系から、あるいは特定の抗原決定基をコードする遺伝子でトランスフェクトされて該遺伝子を発現している細胞または細胞系から、商業的に実施可能な量のストレスタンパク質-ペプチドワクチンを迅速かつコスト効率的に調製する方法を提供することである。さらに他の目的は、免疫学的に非反応性のストレスタンパク質およびペプチドをin vitroで再構成して、所定の細胞内病原体に対する免疫応答刺激能を有する免疫反応性複合体を製造することにより、免疫原性ストレスタンパク質-ペプチドサブユニットワクチンを調製する方法を提供することである。

本発明のこれらのおよび他の目的と特徴は以後の記載、図面、請求の範囲から明らかになるだろう。

発明の概要

今回、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を含むサブユニットワクチンは、所定の細胞内病原体を感染させた細胞から単離して哺乳動物に投与したところ、該病原体に感染した細胞に対する細胞性免疫応答を効果的に刺激しうることが見いだされた。特に、この免疫応答は細胞内病原体を含む細胞を標的として該細胞を破壊する細胞障害性T細胞カスケードにより媒介される。

ここに記載の方法に従って調製されるワクチンは細胞性免疫を刺激するための代替法を提供し、結果的に、生きている（弱毒化されたまたはそうでない）細胞内病原体の使用を不要にするものである。加えて、ここに記載のワクチンは同定された抗原決定基、またはまだ同定されていない抗原決定基を有する細胞内病原体に対する免疫応答を誘導するのに理想的である。さらに、こうしたワクチンは、抗原決定基が多様であるか絶えず変化するため、抗原決定基の単離および特性付けが実際的でない細胞内病原体に対する免疫応答を誘導するために用いることができる。

好ましい態様において、本発明は所定の細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を哺乳動物において誘導するための哺乳動物投与用のワクチンを包含する。また、ワクチンは哺乳動物の体内で所定の細胞内病原体による感染に対する抵抗性を、細胞障害性T細胞応答によって、誘導しうると考えられる。ここに記載の原理に従って製造されたワクチンは、レシピエントの体内で対象の病原体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激しうる免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体を含有する。この複合体は製剤学的に許容しうるキャリアー、アジュバントまたは賦形剤と組み合わせて当技術分野で公知の技術により哺乳動物に投与される。

ここで用いる「ワクチン」とは、少なくとも1つの抗原決定基を有するストレスタンパク質-ペプチド複合体を含有し、哺乳動物に投与したとき該抗原決定基に対する免疫応答を刺激することができる組成物を意味するものである。

ここで用いる「ストレスタンパク質」とは、次の基準を満たすあらゆる細胞性タンパク質を意味するものと理解される。それは細胞をストレスの多い刺激にさらしたときに細胞内濃度が増加するタンパク質であり、他のタンパク質またはペプチドと結合することができ、結合したタンパク質またはペプチドをアデノシン三リン酸（ATP）または低pHの存在下で放出することができるタンパク質である。ストレスの多い刺激としては熱ショック、栄養の欠乏、代謝的破壊、酸素ラジカル、細胞内病原体による感染が含まれるが、これらに限らない。

ここに記載のストレスタンパク質-ペプチドワクチンの調製には、非天然型、末端切断型類似体、突然変異タンパク質、融合タンパク質、およびストレスタン

パク質のペプチド結合性と免疫原性を模倣しうる他のタンパク質を含む他の組換えストレスタンパク質を使用できることが、この開示を読んだ当業者には明らかであろう。

最初に同定されたストレスタンパク質は熱ショックタンパク質 (H s p) であった。その名が示すとおり、H s p は熱ショックに応答して細胞により誘導される。3つの主要なH s p ファミリーが同定されており、それぞれの分子量が約60、70および90 kDであることからH s p 60、H s p 70およびH s p 90と呼ばれている。その後、上記のような他のストレス刺激に応答して、これらのファミリーの多くのメンバーが誘導されることが判った。

ストレスタンパク質はあらゆる原核および真核生物に存在していて、進化の過程で非常によく保存されている。例えば、大腸菌由来のH s p 70であるD n a Kは真核生物由来のH s p 70タンパク質とのアミノ酸配列同一性が約50%に達する (Bardwellら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. 81:848-852)。H s p 60およびH s p 90ファミリーも同様に高レベルのファミリー内保存を示す(Hickeyら(1989)Mol. Cell. Biol. 9:2615-2626; Jindal(1989)Mol. Cell. Biol. 9:2279-2283)。さらに、H s p 60、H s p 70およびH s p 90ファミリーは、配列の点でストレスタンパク質に関係があつて、例えば35%以上のアミノ酸同一性を有するが、その発現レベルが一般に宿主細胞にストレスをかけた条件下で未変化のままであるタンパク質を含んでいる。こうしたタンパク質の一例として、構成的に発現される細胞質ゾルタンパク質H s c 70があり、これはアミノ酸配列の点でストレス誘導タンパク質H s p 70と関連がある。従って、ここで用いるストレスタンパク質の定義は、細胞内の発現レベルがストレス刺激に応答して刺激される3ファミリーのメンバーとのアミノ酸同一性が35~55%、好ましくは55~75%、最も好ましくは75~95%である他のタンパク質、突然変異タンパク質、類似体およびそれらの変異体を含むものである。

ここで用いる「ペプチド」とは、細胞内病原体に感染している真核細胞中に存在するが、同一病原体に感染していない場合は該細胞中に存在しない、あらゆるアミノ酸配列を意味するものと理解される。この定義は病原体それ自体に由来するペプチドばかりでなく、細胞内病原体感染に応答して感染細胞により合成され

たペプチドをも包含する。

ここで用いる「免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体」とは、哺乳動物の体内で免疫応答を誘導することができる、ストレスタンパク質とペプチドを含むあらゆる複合体を意味するものと理解される。好ましくは、ペプチドはストレスタンパク質と非共有結合的に複合体化されている。こうした複合体にはH s p 60-ペプチド、H s p 70-ペプチドおよびH s p 90-ペプチド複合体が含まれるが、これらに限らない。本発明の好ましい態様では、H s p 90ファミリーに属するストレスタンパク質、すなわちg p 96、を用いてg p 96-ペプチド複合体を含む有効なワクチンが調製される。ATPまたは低pHの存在下では複合体からペプチドが解離され得るので、所定の細胞内病原体に感染した細胞から抗原性でありうるペプチドを単離することができる。その結果、関心のある潜在的な細胞内病原体の抗原決定基をここに記載の方法論を用いて容易に同定することができる。

ここで用いる「細胞障害性T細胞」という用語は、細胞表面にクラスI組織適合遺伝子複合体を有しかつ細胞内病原体に感染している標的細胞と接触して該細胞を溶解することができる、細胞表面糖タンパク質マーカーCD8を発現するTリンパ球を意味するものと理解される。「細胞障害性T細胞応答」とは、細胞障害性T細胞によって媒介されるあらゆる細胞障害活性を意味するものである。

ここで用いる「細胞内病原体」とは、哺乳動物細胞内に存在して哺乳動物に病気を起こさせるウイルス、バクテリア、真菌、原虫および細胞内寄生体を含むがこれらに限らない、あらゆる生存能のある生物を意味するものである。

本発明の好ましい態様において、ストレスタンパク質-ペプチドワクチンは、細胞内病原体によって引き起こされたヒト疾病を治療するのに特に有用である。また、ここに記載の原理を用いて開発されたワクチンは他の動物、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタを含めた家畜、ネコやイヌを含めたペットの病気を治療するにも有用であるだろう。

ウイルスに感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンを調製しうるが、こうしたウイルスにはA型肝炎、B型肝炎およびC型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスI

型(HSV-I)、単純ヘルペスII型(HSV-II)、牛痘ウイルス、リノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、RSウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス、コクサッキーウイルス、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全ウイルスI型(HIV-I)、およびヒト免疫不全ウイルスII型(HIV-II)が含まれるが、これらに限らない。また、マイコバクテリア属、リケッチア属、マイコプラズマ属、ナイセリア属、レジオネラ属を含むがこれらに限らない細胞内バクテリアに感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製する。さらに、リーシュマニア属、コクジジオア(Kokzidioa)属、トリパノソーマ属を含むがこれらに限らない細胞内原虫に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製する。クラミジア属、リケッチア属を含むがこれらに限らない細胞内寄生体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製する。

本発明の他の好ましい態様において、ストレスタンパク質-ペプチドワクチンは治療上有効な量のサイトカインをさらに含むことができる。ここで用いる「サイトカイン」とは、免疫応答を媒介する他の細胞の機能に影響を及ぼす分泌ポリペプチドを意味する。現在好ましいサイトカインとしては、インターロイキン-1 α (IL-1 α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-5(IL-5)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-9(IL-9)、インターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-11(IL-11)、インターロイキン-12(IL-12)、インターフェロン α (IFN α)、インターフェロン β (IFN β)、インターフェロン γ (IFN γ)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、腫瘍壊死因子 β (TNF β)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、およびトランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)が挙げられる。他のまだ発見されていないサイトカイン類も本発明にお

いて有効であると考えられる。さらに、慣用の抗生物質もストレスタンパク質－ペプチド複合体とともに投与することができる。しかし、適当な抗生物質またはそれらの組合せの選択は対象となる疾病に依存するだろう。

このワクチンは主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I カスケードにより細胞障害性 T 細胞応答を刺激することが見いだされた。それゆえ、細胞障害性 T 細胞応答は治療上有効な量の 1 種以上のサイトカイン (細胞障害性 T 細胞応答を増強またはモジュレートする) とともにワクチンを投与することによって増強しうると考えられる。

他の好ましい態様では、本発明は、哺乳動物において所定の細胞内病原体に感染した細胞に対する細胞性免疫応答、特に細胞障害性 T 細胞応答、を刺激する方法を提供する。この方法は、ここに記載の原理に従って製造したワクチンを、哺乳動物の体内で所定の細胞内病原体に感染した細胞に対する細胞障害性 T 細胞応答を引き出すのに十分な量で哺乳動物に投与することを含む。

このワクチンは、細胞内病原体による哺乳動物へのその後の感染を防止する細胞障害性 T 細胞応答を刺激するために、哺乳動物に予防的に投与することができる。また、このワクチンは細胞内病原体が原因で発病した哺乳動物に治療的に投与することもできる。このワクチンは細胞内病原体に現在感染している細胞に対する細胞障害性 T 細胞応答を刺激しうると考えられる。

ストレスタンパク質－ペプチドワクチンのファミリーの投与量および投与方法はその複合体の性質、細胞内病原体、対象となる疾病の性質に必然的に左右されるだろう。この複合体の投与量は細胞内病原体に対する細胞障害性 T 細胞応答を開始するのに十分な量とすべきである。一般に、投与されるストレスタンパク質－ペプチド複合体の量は 1 回の免疫感作につき約 0.1 ~ 1000 μ g (複合体) / kg (哺乳動物の体重) の範囲であり、1 回の免疫感作につき約 0.5 ~ 100 μ g / kg の範囲が好ましい。レシピエントは好ましくは週に 1 回の間隔で 4 回のワクチン注射を受けるべきである。必要に応じて、後日の追加ワクチン投与により応答を増強してもよい。しかし、最適投与量とワクチン接種計画の決定は、当分野でよく知られた慣用技術を用いてそれぞれのストレスタンパク質－ペ

プチドワクチンについて当業者が経験的事実に基づいて行うのがよいと考えられる。

他の態様において、本発明は、哺乳動物に投与したとき、所定の抗原に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を哺乳動物の体内で誘導しうる、商業的に入手可能な量のストレスタンパク質-ペプチドワクチンを調製するための各種方法を提供する。一つのアプローチとして、所定の細胞内病原体に感染した組織、単離細胞もしくは不死化細胞系、または所定の抗原決定基をコードする遺伝子でトランスフェクトされて該遺伝子を発現している単離細胞もしくは不死化細胞系のサンプルから、通常のタンパク質精製法を用いて、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を単離することができる。精製された複合体はその後貯蔵されるか、ワクチンとして投与するために製剤学的に許容されるキャリアーと組み合わせられる。

また、潜在的に抗原性のあるペプチドとストレスタンパク質をin vitroで再構成することによりストレスタンパク質-ペプチド複合体を調製することもできる。例えば、当技術分野で公知の方法を用いて、精製したストレスタンパク質-ペプチド複合体またはMHC-ペプチド複合体から抗原性ペプチドを溶離することができる。特に、ストレスタンパク質-ペプチド複合体をATPまたは低pHの存在下でインキュベートすると、この複合体から該ペプチドが溶離される。

これとは別に、MHC-ペプチド複合体をトリフルオロ酢酸(TFA)の存在下でインキュベートすると、この複合体から該ペプチドが溶離される。得られたペプチドを逆相HPLCで精製して、標準的なタンパク質配列解析法によりそのアミノ酸配列を決定し、その後、通常のペプチド合成法を使って規定配列のペプチドを合成することができる。ストレスタンパク質は自然界でそのストレスタンパク質を発現している細胞から直接精製することができる。また、非天然型、末端切断型類似体、突然変異タンパク質、融合タンパク質、およびストレスタンパク質のペプチド結合性と免疫原性を模倣しうる他の構築物を含む組換えストレスタンパク質を通常の組換えDNA技術により発現させることもできる。例えば、真核または原核発現系において組換えDNAから組換えストレスタンパク質を発

現させ、その発現系から精製する。その後、精製した2成分をin vitroで一緒に合わせて、完全に規定された合成ストレスタンパク質-ペプチド複合体を形成させる。続いて、所定の細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するの

に有効な候補複合体を同定するために、組換え複合体の免疫原性と特異性をin vitroおよびin vivoでアッセイする。いったん同定されたら、合成複合体を任意のスケールで製造し、そのまま貯蔵するか、または哺乳動物に投与するために製剤学的に許容されるキャリアーと組み合わせる。

図面の簡単な説明

本発明の上記の、そして他の目的および特徴、並びに本発明それ自体は、添付の図面を参照するとき、以下の記載からより一層理解されるであろう。

図1は、PR8インフルエンザウイルス由来の核タンパク質(NP)遺伝子でトランスフェクトしたBALB/c繊維芽細胞から回収されたgp96-ペプチド複合体を用いて免疫したマウスに由来する脾細胞の抗原特異的な細胞障害性T細胞活性を示す。細胞障害活性はNP遺伝子を発現するBALB/c繊維芽細胞(黒丸)、NP遺伝子を発現するが抗MHCタイプI抗血清K44で処理したBALB/c繊維芽細胞(白丸)、および同系の非NPトランスフェクト細胞株5117(星印)からの⁵¹Crの放出によりアッセイした。

図2は、SV40で形質転換したSVB6細胞から回収されたgp96-ペプチド複合体を用いて免疫したマウスに由来する脾細胞の抗原特異的な細胞障害性T細胞活性を示す。細胞障害活性はSVB6細胞(黒の三角)および非SV40形質転換同系細胞株MCA(白の三角)からの⁵¹Crの放出によりアッセイした。

図3A~3Dは、再構成したHsp70-ペプチド複合体[このペプチドは配列:SLSDLRGYVYQGL(配列番号1)を有する]を用いて免疫したマウスに由来する脾細胞の抗原特異的な細胞障害性T細胞活性を示す。アッセイを実施する前に、各マウス由来の脾細胞を、ペプチドSLSDLRGYVYQGL(配列番号1)を発現する致死照射細胞で1回(3Aおよび3C)または2回(3Bおよび3D)in vitroで刺激した。細胞障害活性はペプチドを発現するEL

4細胞（黒の三角）およびペプチドを発現しないEL4細胞（白の三角）からの⁵¹Crの放出によりアッセイした。

詳細な説明

本発明は、ストレスタンパク質-ペプチド複合体が、それを所定の細胞内病原体に感染した真核細胞から単離して、その後哺乳動物に投与したとき、同一病原体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するという知見に基づくものである。この知見はワクチン開発の分野に大きな進歩をもたらすものである。

本発明によると、細胞内病原体が原因で起こる疾病に対して哺乳動物を免疫するための一つのワクチンファミリーを提供すべく上記の知見が利用された。原則として、ワクチンは何らかの細胞内病原体、例えばウイルス、バクテリア、原虫、真菌、細胞内寄生体に対して調製される。こうしたクラスの病原体の全てに対するワクチンを調製するのに有用な一般的方法を以下に詳述する。

当業者には理解されるように、ここに記載のストレスタンパク質-ペプチドワクチンは現在使用されているワクチンと比べていくつかの利点がある。第一に、ストレスタンパク質-ペプチドワクチンは細胞性免疫を刺激するための代替法を提供し、無傷の細胞内（弱毒化されたまたはそうでない）病原体の使用を不要にする。第二に、このワクチンは無傷の生物を含んでいないので、発病の危険性が低下する。第三に、ここに記載のワクチンは、細胞内病原体から単離されて同定された抗原決定基、またはまだ同定されていない抗原決定基に対する免疫応答を誘導するのに理想的である。その上、新たな抗原コートタンパク質を進化させることによって通常は免疫系を免れる病原体、例えばインフルエンザウイルス、に対して有効なワクチンを調製することができる。第四に、このタイプのワクチンは原則的に関心のあるどのような細胞内病原体に対しても調製することができる。第五に、このワクチンは以下に記載する方法を用いて合成的に製造することができ、それによりヒトへの投与に適する完全に規定されたワクチンが得られる。

本発明によるワクチンは予防的にも治療的にも投与できると考えられる。予防的に投与する場合は、被ワクチン接種者が細胞内病原体によるその後の感染に抵

抗できるように、ワクチンが哺乳動物の体内で細胞障害性T細胞応答を刺激する。また、治療的に投与する場合は、ワクチンが目下哺乳動物に感染して病気を引き起こしている病原体に対する細胞障害性T細胞応答を刺激する。

レシピエンドの体内で病原体に対する特異的な細胞障害性T細胞応答を誘導す

るワクチンの特定成分はストレスタンパク質-ペプチド複合体である。このペプチドは細胞内病原体に感染した真核細胞中に存在するが該病原体に感染していない細胞中には存在しない任意のアミノ酸配列でありうる。それには該病原体そのものに由来するペプチドのみならず細胞内病原体の感染に応答して感染細胞により合成されるものも含まれる。

免疫原性複合体は、細胞内病原体に感染した全組織、単離細胞および不死化真核細胞系を含めた真核細胞から精製することができる。複合体の精製には当分野でよく知られた慣用のタンパク質精製技術が用いられる。例えば、インフルエンザウイルスに対する細胞障害性T細胞応答を刺激しうる免疫原性複合体は、インフルエンザウイルスに感染している真核細胞系から単離することができる。

さらに、このペプチドはATPまたは低pHの存在下でストレスタンパク質-ペプチド複合体から溶離させることもできることが判った。ペプチドもストレスタンパク質も個々には細胞障害性T細胞応答を効果的に誘導することはできない。しかし、こうした実験条件を用いて、有効な抗原決定基を含みうる感染細胞からペプチドを単離することができる。いったん単離されたならば、それぞれの抗原ペプチドのアミノ酸配列を通常のアミノ酸配列解析法により決定する。その結果、対象となる細胞内病原体の抗原決定基をここに記載の方法論を用いて簡単に同定することができる。以下に詳述するとおり、この特性は完全合成ワクチンの製造にも利用される。

同様に、免疫原性でありうるペプチドは当分野で公知の技術を用いてMHC-ペプチド複合体から溶離することもできる。例えば、Falkら(1990) Nature 348: 248-251; Rotzscheら(1990) Nature 348:252-254; Elliottら(1990) Nature 348:195-197; Falkら(1991) Nature 351:290-296; Demotzら(1989) Nature 334:682-684; Rotzscheら(1990) Science 249:283-287を参照されたい(これらの開示内

容を参考としてここに組み入れる)。MHC複合体から溶離されたペプチドは防御可能な抗原決定基を規定しうるが、単離ペプチドを通常のサブユニットワクチンとして投与しても、レシピエントにおいて細胞障害性T細胞応答を刺激するのに有効ではないと認められる。従って、ここに記載の方法を用いて、MHC-ペプチド複合体から溶離されたペプチドをストレスタンパク質と組み合わせ

せて再構成することにより、抗原ペプチド発現細胞を標的として該細胞を溶解しうる細胞障害性T細胞応答を刺激するのに有効なストレスタンパク質-ペプチド複合体を形成させることが意図される。

本発明の実施に際して有用なストレスタンパク質は次の基準を満たす細胞性タンパク質として規定される。それは細胞をストレスの多い刺激にさらしたときに細胞内濃度が増加するタンパク質であり、他のタンパク質またはペプチドと結合することができ、結合したタンパク質またはペプチドをアデノシン三リン酸(ATP)または低pHの存在下で放出することができるタンパク質である。

最初に同定されたストレスタンパク質は熱ショックタンパク質(Hsp)であった。その名が示すとおり、Hspは熱ショックに応答して細胞により合成される。今日までに、3つの主要なHspファミリーが分子量に基づいて同定されている。これらのファミリーはHsp60、Hsp70およびHsp90と呼ばれており、これらの数字がストレスタンパク質の概算分子量(kD)を示している。その後、栄養の欠乏、代謝的破壊、酸素ラジカル、細胞内病原体による感染を含むがこれらに限らない、ストレスの多い他の刺激に応答して、これらのファミリーの多くのメンバーが誘導されることが判った。例えば、Welch(May 1993) Scientific American 56-64; Young(1990) Annu. Rev. Immunol. 8:401-420; Craig(1993) Science 260:1902-1903; Gethingら(1992) Nature 355:33-45;およびLindquistら(1988) Annu. Rev. Genetics 22:631-677を参照されたい(これらの開示内容を参考としてここに組み入れる)。従って、本発明を実施する際にはこれら全てのファミリーに属するストレスタンパク質を用いることができると考えられる。

主なストレスタンパク質はストレスを受けた細胞中に非常に高い濃度で蓄積さ

れるが、ストレスにさらされていない細胞ではそれらは低いし中程度の濃度で存在している。例えば、高度に誘導性の哺乳動物H s p 7 0は常温ではめったに検出されないが、熱ショック後には細胞中で最も活発に合成されるタンパク質の一つとなる (Welchら(1985), J. Cell. Biol. 101:1198-1211)。これに対して、H s p 9 0およびH s p 6 0タンパク質は全部ではないにしても大部分の哺乳動物細胞中に常温で豊富に存在しており、熱によってさらに誘導される (Laiら

(1984), Mol. Cell. Biol. 4:2802-10; van Bergen en Henegouwenら(1987), Genes Dev. 1:525-531)。

ストレスタンパク質はその存在が最も高度に保存されたタンパク質の部類に入る。例えば、大腸菌由来のH s p 7 0であるD n a Kは真核生物由来のH s p 7 0タンパク質とのアミノ酸配列同一性が約50%である (Bardwellら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. 81:848-852)。H s p 6 0およびH s p 9 0ファミリーも同様に高レベルのファミリー内保存を示す (Hickeyら(1989) Mol. Cell. Biol. 9:2615-2626; Jindal(1989)Mol. Cell. Biol. 9:2279-2283)。さらに、H s p 6 0、H s p 7 0およびH s p 9 0ファミリーは、配列の点でストレスタンパク質に関係があつて、例えば35%以上のアミノ酸同一性を有するが、その発現レベルが一般に宿主細胞にストレスをかけた条件下で未変化のままであるタンパク質を含んでいる。こうしたタンパク質の一例として、構成的に発現される細胞質ゾルタンパク質H s c 7 0があり、これはアミノ酸配列の点でストレス誘導タンパク質H s p 7 0と関連がある。従つて、ここで用いるストレスタンパク質の定義は、細胞内の発現レベルがストレス刺激に応答して刺激される3ファミリーのメンバーとのアミノ酸同一性が35~55%、好ましくは55~75%、最も好ましくは75~95%である他のタンパク質、突然変異タンパク質、類似体およびそれらの変異体を含むものである。こうした3ファミリーに属するストレスタンパク質の精製を以下に記載する。

本発明の免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体は、ストレスタンパク質とペプチドを含み、哺乳動物の体内で免疫応答を誘導することができる、あらゆる複合体を含むものである。好ましくは、ペプチドはストレスタンパク質と非

共有結合的に複合体化されている。好ましい複合体にはH s p 60-ペプチド、H s p 70-ペプチドおよびH s p 90-ペプチド複合体が含まれるが、これらに限らない。例えば、真核細胞の小胞体中に存在していて細胞質H s p 90類と関係があるg p 96と呼ばれるストレスタンパク質は、g p 96-ペプチド複合体を含む有効なワクチンの製造に用いられる。

低分子量熱ショックタンパク質の別のファミリーが今回同定され、それらをH s p 25/H s p 27と名づけた。かかるタンパク質の精製を後述する。こうし

た低分子量タンパク質も本発明において有用であると考えられる。

また、本発明のストレスタンパク質-ペプチド複合体は、細胞内病原体に感染した細胞および細胞内病原体によって形質転換された細胞から調製できることが判明した。例えば、SV40のようなトランスフォーミングウイルスにより形質転換された真核細胞から、免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体を単離することができる（下記参照）。

本発明の好ましい態様において、精製されたストレスタンパク質-ペプチドワクチンは細胞内病原体が原因で発症したヒト疾病の治療に特に有用である。また、ここに記載の原理を用いて開発されたワクチンは、同様に細胞内病原体によって引き起こされた他の哺乳動物の病気、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタを含めた家畜、ネコやイヌを含めたペットの病気を治療するにも有用であるだろう。

ここに記載の方法に従うと、A型肝炎、B型肝炎およびC型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、HSV-I、HSV-II、牛痘ウイルス、リノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、RSウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、フンタウイルス、コクサッキーウイルス、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、HIV-IおよびHIV-IIを含むがこれらに限らないウイルスに感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンを調製することができる。同様に、マイコバクテリア属、リケッチア属、マイコプラズマ属、ナイセリア属、レジオネラ属を含むがこ

れらに限らない細胞内バクテリアに感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製しうる。さらに、リーシュマニア属、コクジジオア(Kokzidioa)属、トリパノソーマ属を含むがこれらに限らない細胞内原虫に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製しうる。クラミジア属、リケッチア属を含むがこれらに限らない細胞内寄生体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激するワクチンも調製しうる。

I. 感染真核細胞の増殖

当業者には理解されるように、本明細書に記載するプロトコールを使用して、任意の真核細胞、例えば組織、単離細胞、あるいは予め選択された細胞内病原体により感染された不死化真核細胞系から、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を単離することができる。

不死化動物細胞系をストレスタンパク質-ペプチド複合体の供給源として使用する場合、いうまでもなく対象の病原体により感染され得る細胞系を使用することが重要である。さらに、意図されるワクチンのレシピエントと同じ種に由来する細胞を使用することが好ましい。

例えば、ヒトに投与するためのHIV-Iに対して有効なストレスタンパク質-ペプチド複合体を製造するために、ウイルスをヒト細胞で増殖させることができる。そのようなヒト細胞としては、限定するものではないが、ヒトCD4+T細胞、Hep G2細胞、及びU937前単球細胞がある。ヒトに投与するためのHIV-IIに対して有効なストレスタンパク質-ペプチド複合体を製造するためには、ウイルスを例えばヒトCD4+T細胞中で増殖させることができる。同様に、インフルエンザウイルスは例えばヒト繊維芽細胞系及びMDCK細胞で増殖させることができ、マイコバクテリアは例えばヒトシュワン(Schwaan)細胞中で培養できる。

細胞内病原体が感染細胞を溶解しない場合は、感染細胞を正常な非感染細胞と同様の条件下で培養する。例えば、マイコバクテリアは新生児スイス白マウスの知覚神経節の神経培養物中で培養できる。神経細胞は、0.006%グルコース、20%ウシ胎児血清、10%ニワトリ胚抽出物及びシトシンアラビノシドを補充した70%ダルベッコ改変イーグル最小必須培地(DMEM)を含む増殖培地中で培養する。8~10

日後、未治療のらい腫らい患者の新鮮な小結節から単離された $5 \sim 8 \times 10^5$ マイコバクテリアを培養物に接種する。感染細胞は37℃で6週間まで培養し、その後感染細胞を回収し、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を単離することができる。例えば、Mukherjeeら (1985) J. Clin. Micro. 21:808-814を参照されたい (この文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。

一方、宿主細胞が対象の病原体により溶解される場合には (インフルエンザウイルスの場合のように)、宿主細胞の溶解の直前に細胞を洗浄し回収すれば細胞

をやはり標準的な条件下で増殖させることができる。例えば、インフルエンザ感染細胞からストレスタンパク質-ペプチド複合体を精製する際には、繊維芽細胞 (あるいはその他の種類の細胞) に細胞あたり 5~10 プラーク形成単位 (PFU) のウイルスを37℃で1時間感染させる。感染細胞はそのままのDMEM培地中で24時間37℃で培養することができる。24時間後、溶解の前に細胞を洗浄し回収する。ストレスタンパク質-ペプチド複合体は以下に記載する手順を使用して単離することができる。

さらに、特定の抗原決定基をコードする遺伝子が同定されている場合には、対象の遺伝子を当分野で周知の技術を用いて不死化されたヒト細胞系あるいは他の哺乳動物細胞系中にトランスフェクトし発現させることができる。例えば、“Current Protocols in Molecular Biology” (1989), Ausubel FM編, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K, Wiley Interscienceを参照されたい (この文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。トランスフェクト細胞は、標準的な条件下で増殖させ、その後複合体を単離することができる。

II. ストレスタンパク質及び免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体の調製

Hsp70-ペプチド複合体、Hsp90-ペプチド複合体、gp96-ペプチド複合体、Hsp70、Hsp25/Hsp27及びHsp60の調製方法を以下に記載する。

(a) Hsp70-ペプチド複合体の精製

感染細胞のペレットを5 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7)、150mM NaCl、2 mM

CaCl₂、2 mM MgCl₂ 及び 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) からなる 1X 溶解緩衝液の 3 倍容量中に再懸濁する。顕微鏡で観察して 99% を越える細胞が溶解されるまでペレットを氷上で超音波処理する。あるいは、機械的剪断により細胞を溶解してもよい。この方法においては、細胞を 30 mM 重炭酸ナトリウム pH7.5、1 mM PMSF 中に再懸濁し、氷上で 20 分間インキュベートし、その後ダウンス (Dounce) ホモジナイザーで 95% を越える細胞が溶解されるまでホモジ

ナイズする。

溶解物を 1000g で 10 分間遠心分離し、非破壊細胞、核及びその他の破片を除去する。この遠心分離段階からの上清をその後 100,000g で 90 分間再度遠心分離する。

上清を、2 mM Ca²⁺ 及び 2 mM Mg²⁺ を含む PBS で平衡化した Con A Sepharose と 4℃ で 2～3 時間混合する。細胞を機械的剪断により溶解する場合、上清を手順にかける前に等容量の 2X 溶解緩衝液で希釈する。その後スラリーをカラムに充填し、1X 溶解緩衝液で洗浄する。結合しない物質を 10 mM トリス-酢酸 pH7.5、0.1 mM EDTA、10 mM NaCl、1 mM PMSF に対して 36 時間透析する (3 回、各回 100 倍容量)。透析物を 17,000rpm で 20 分間遠心分離し (Sorvall SS34 ローター)、得られる上清を 20 mM トリス-酢酸 pH7.5、20 mM NaCl、0.1 mM EDTA 及び 15 mM 2-メルカプトエタノールで平衡化した Mono Q FPLC カラム (Pharmacia) にかける。その後タンパク質を 20 mM～500 mM の NaCl 勾配により溶出する。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と、適当な抗-Hsp70 抗体 (例えば StressGen からのクローン N27F3-4) を使用したイムノブロットによりフラクションの特性付けを行う。

抗体と強い免疫反応性を示したフラクションをプールし、Hsp70-ペプチド複合体を硫酸アンモニウムで沈殿させる。複合体は 50%～70% 硫酸アンモニウムカットにおいて沈殿する。タンパク質ペレットを 17,000rpm で遠心分離 (SS34 Sorvall ローター) により回収し、70% 硫酸アンモニウムで洗浄する。その後ペレットを可溶化し、残留硫酸アンモニウムを Sephadex® G25 カラム (Pharmacia) 上で

のゲル濾過により除去する。

Hsp70-ペプチド複合体は、この方法を使用して見かけ上均質に精製できる。1 gの細胞/組織から最高1 mgのHsp70-ペプチド複合体が精製され得る。

(b) Hsp70の精製

Hsp70ポリペプチドは、ATPアガロースクロマトグラフィーによりHsp70-ペプチド複合体から精製できる。例えば、Welchら (1985) Mol. Cell. Biol. 5:1229を参照されたい (この開示内容を参考としてここに組み入れる)。簡単に記載

すると、先に単離した複合体に MgCl_2 を最終濃度3 mMとなるまで加える。その後複合体を20mM トリス-酢酸(pH7.5)、20mM NaCl、0.1mM EDTA、15mM 2-メルカプトエタノール、3 mM MgCl_2 で平衡化したATPアガロースカラム(Sigma Chemical Co.)にかける。カラムを0.5M NaClを含む平衡化緩衝液により十分に洗浄し、その後NaClを含まない緩衝液で洗浄する。次いで3 mM ATP(Sigma Chemical Co.)を含む平衡化緩衝液でHsp70をカラムから溶出する。

(c) Hsp90-ペプチド複合体の精製

感染細胞のペレットを5 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)、150mM NaCl、2 mM CaCl_2 、2 mM MgCl_2 及び1 mM PMSFからなる1X溶解緩衝液の3倍容量中に再懸濁する。顕微鏡で観察して95%を越える細胞が溶解されるまで細胞ペレットを氷上で超音波処理する。あるいは、前述のように機械的剪断により細胞を溶解してもよい。

溶解物を1000gで10分間遠心分離し、非破壊細胞、核及びその他の破片を除去する。この遠心分離段階からの上清をその後100,000gで90分間再度遠心分離する。

その後上清を、2 mM Ca^{2+} 及び2 mM Mg^{2+} を含むPBSで平衡化したCon A Sepharoseと4℃で2～3時間混合する。細胞を機械的剪断により溶解する場合は、上清を手順にかける前に等容量の2X溶解緩衝液で希釈する。その後スラリーをカラムに充填し、1X溶解緩衝液で洗浄する。結合しない物質を20mM リン酸ナトリウムpH7.4、1 mM EDTA、250mM NaCl、1 mM PMSFに対して36時間透析する(3回、各回100倍容量)。透析物を17,000rpmで20分間遠心分離する(Sorvall SS34ローター)。

得られる上清を溶解緩衝液で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia)にかけ、結合したタンパク質を200mM～600mM NaClの塩勾配により溶出する。

溶出したフラクションをSDS-PAGEにより分析し、抗-Hsp90抗体(例えばAffinity Bioreagentsからの3G3)を使用したイムノブロットによりHsp90複合体を同定する。Hsp90は、この方法を使用して見かけ上均質に精製できる。1gの細胞/組織から約150～200 μ gのHsp90を通常の操作で精製できる。

(d) gp96-ペプチド複合体の精製

感染細胞のペレットを30mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)及び1mM PMSFからなる緩衝液の4倍容量中に再懸濁し、細胞を氷上で20分間膨潤させる。細胞ペレットを氷上でダウンスホモジナイザーにより(ホモジナイザーの適当なクリアランスは各細胞の種類により変化する)95%を越える細胞が溶解されるまでホモジナイズする。

溶解物を1000gで10分間遠心分離し、非破壊細胞、核及びその他の破片を除去する。この遠心分離段階からの上清をその後100,000gで90分間再度遠心分離する。gp96-ペプチド複合体は、この100,000gペレットからあるいは上清から精製できる。

上清から精製する場合は、上清を等容量の2X溶解緩衝液により希釈し、2mM Ca^{2+} 及び2mM Mg^{2+} を含むPBSで平衡化したCon A Sepharoseと4℃で2～3時間混合する。その後スラリーをカラムに充填し、OD₂₈₀ がベースラインに低下するまで1X溶解緩衝液で洗浄する。その後カラムを、1/2カラム床容量の2mM Ca^{2+} 及び2mM Mg^{2+} を含むPBS中に溶解した10% α -メチルマンノシド(α -MM)で洗浄し、カラムを一枚のパラフィルムで密閉し、37℃で15分間インキュベートする。その後カラムを室温に冷却し、カラムの底部からパラフィルムを除去する。5倍カラム容量の α -MM緩衝液をカラムに入れ、溶出物をSDS-PAGEで分析する。通常得られる物質は約60～95%純度であるが、これは細胞の種類及び使用する組織対溶解緩衝液の比率に依存する。その後試料を5mMリン酸ナトリウムを含む緩衝液、pH7で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia)に入れる。次いでタンパク質を0～1MのNaCl勾配によりカラムから溶出する。gp96フラクションは400mM～550mM Na

Clで溶出する。

この手順を、単独で使用してもあるいは組み合わせて使用してもよい2つの追加的な段階により改変して、見かけ上均質なgp96-ペプチド複合体を一貫して調製することができる。一つの任意の段階はCon A精製段階の前に硫酸アンモニウム沈殿を使用するものであり、もう一つの任意の段階はCon A精製段階の後で、Mono Q FPLC段階の前にDEAE-Sepharose精製を採用するものである。

最初の任意の段階においては、100,000g遠心分離段階から得られた上清に硫酸アンモニウムを加えて50%硫酸アンモニウムの最終濃度にする。硫酸アンモニウムは、氷水を入れたトレー中に置いたビーカー中の溶液に、この溶液を穏やかに攪拌しながらゆっくりと加える。溶液を約2～12時間4℃で攪拌し、得られる溶液を6,000rpmで遠心分離する(Sorvall SS34 ローター)。この段階から得られた上清を取り出し、硫酸アンモニウムを加えて70%硫酸アンモニウム飽和とし、6,000rpmで遠心分離する(Sorvall SS34 ローター)。この段階から得られたペレットを回収し、70%硫酸アンモニウムを含むPBS中に再懸濁してペレットをリンスする。この混合物を6,000rpmで遠心分離し(Sorvall SS34 ローター)、ペレットを2 mM Ca^{2+} 及び Mg^{2+} を含むPBS中に溶解する。15,000rpmで短時間遠心分離して(Sorvall SS34 ローター)未溶解物質を除去する。その後溶液をCon A Sepharoseと混合し前記と同様に操作する。

2番目の任意の段階においては、Con Aカラムから溶出されたgp96含有フラクションをプールし、透析により5 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7、300mM NaClに緩衝液交換し、あるいは好ましくはSephadex G25カラム上で緩衝液交換する。緩衝液交換の後、溶液を予め5 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7、300mM NaClで平衡化されたDEAE-Sepharoseと混合する。タンパク質溶液とビーズを1時間穏やかに混合し、カラムへ注ぐ。次いでカラムを、280nmでの吸光度がベースラインに低下するまで5 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7、300mM NaClで洗浄する。その後、結合したタンパク質を5倍容量の5 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7、70 mM NaClでカラムから溶出する。タンパク質を含むフラクションをプールし、5 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7で希釈して塩濃度を175mMまで低下させる。得

られた物質を5mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7で平衡化したMono Q FPLCカラム(Pharmacia)に入れ、Mono Q FPLCカラム(Pharmacia)に結合したタンパク質を上記のように溶出する。

これらの任意段階を精製プロトコール中に導入することの利益は、当業者であれば日常的な実験により調べることができるであろう。また、これらの任意段階のそれぞれを追加することの利益は出発物質の供給源にも依存するだろう。

gp96フラクションを100,000gペレットから単離する場合は、ペレットを1%デ

オキシコール酸ナトリウムまたは1%オクチルグルコピラノシドを含む(但し Mg^{2+} 及び Ca^{2+} は含まない)5倍容量のPBSに懸濁し、氷上で1時間インキュベートする。懸濁物を20,000gで30分間遠心分離し、得られる上清をPBS(Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含まない)に対し数回透析して界面活性剤を除去する。透析物を100,000gで90分間遠心分離し、上清を回収し、カルシウム及びマグネシウムを上清に加え、それぞれ2mMの最終濃度とする。その後試料を、上記の100,000g上清からgp96-ペプチド複合体を単離するための改変されていないあるいは改変された方法のいずれかにより精製する。

この手順を使用することによりgp96-ペプチド複合体を見かけ上均質になるまで精製できる。1gの細胞/組織から約10~20 μ gのgp90が単離できる。

(e) Hsp25及びHsp27の精製

Hsp25及びHsp27ポリペプチドの精製については以前に開示されているのでここでは詳述しない。例えば、Jakobら(1993) J. Biol. Chem. 268:1517-1520を参照されたい(この文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。

簡単に記載すると、まず細胞溶解物を35%硫酸アンモニウムで沈殿させる。ペレットを遠心分離により回収し、緩衝液中に溶解し、DEAE Sepharose CL-6Bカラム(Pharmacia Biotechnology, Inc)を使用したイオン交換クロマトグラフィーにより分画化する。タンパク質を50~200mM NaCl勾配により溶出する。Hsp25及びHsp27を含むフラクションを適当な抗体を使用したイムノプロットにより同定する。フラクションを合わせ、Superose 6 ゲル濾過カラム(Pharmacia)上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより分画化する。

(f) Hsp60の精製

Hsp60の精製については以前に詳細に論じられているのでここでは詳述しない。例えば、Vitanenら (1992) J. Biol. Chem. 267:695-698を参照されたい(この文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。

簡単に記載すると、まずミトコンドリアマトリックス溶解物を、50mMリン酸ナトリウム、1 mM $MgCl_2$ 、1 mM GTA、pH6.9で平衡化したMono Q FPLCカラム

に入れる。タンパク質を0～1 M NaCl勾配により溶出する。Hsp65含有フラクションをプールし、上述したようなATPアガロスクロマトグラフィーにより分画化する。

III. 組換え体ストレスタンパク質の製造

組換え体ストレスタンパク質及びそのアミノ酸配列変異体は、慣用の組換えDNA法を使用することにより製造できる。例えば、公知のストレスタンパク質あるいはその相同体をコードする組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入し、タンパク質を発現させ、回収し、必要な場合には復元し、精製することができる。現在当分野で知られているストレスタンパク質を下記表1に示す。

表 1

下記Gethingらからのストレスタンパク質のファミリー

<u>生物/オルガネラ</u>	<u>Hsp60</u>	<u>Hsp70</u>	<u>Hsp90</u>
<u>大腸菌</u>	GroEL	<u>DnaK</u>	HtpG(C62.5)
<u>酵母</u>			
/細胞質ゾル		<u>Ssa1-4p</u>	Hsp83/Hsc83
/小胞体		<u>Karp2(BiP)</u>	
/ミトコンドリア	Hsp60(Mif4p)	<u>Ssc1p</u>	
<u>ショウジョウバエ</u>		<u>Hsp68</u>	
		<u>Hsp70</u>	
		<u>Hsc1.2.4</u>	
<u>哺乳動物</u>			
/細胞質ゾル		<u>Hsp70(p73)</u>	Hsp90(Hsp83)
		<u>Hsc70(p72)</u>	Hsp87
/小胞体		<u>BiP(Grp78)</u>	Grp94(Erp99)
			gp96
/ミトコンドリア	Hsp60(Hsp8)	<u>Hsp70(Grp75)</u>	
<u>植物</u>			
/小胞体		<u>b70(BiP)</u>	
/葉緑体	RUSBP		

別名を括弧内に示した。

対象となるアミノ酸配列をコードするDNAを操作し、増幅し、組換える方法は当分野で一般に周知であり、従ってここでは詳細には記載しない。ストレスタン

パク質ファミリーのメンバーをコードする遺伝子を同定し単離する方法もよく知られており、前記特許及びその他の文献に記載されている。

従って、本明細書に開示したような生合成構築物をコードするDNAの構築は、DNAを配列特異的に切断して平滑末端あるいは付着末端を生成する種々の制限酵素、DNAリガーゼ、付着末端を平滑末端DNAに酵素的に付加させる技術、短鎖あるいは中程度の鎖長のオリゴヌクレオチドを組み立てることによる合成DNAの構築、cDNA合成法、及びストレスタンパク質ファミリーのメンバーの遺伝子を単離するための合成プローブ等を使用する公知の技術により行うことができる。発現を達成するのに使用される種々のプロモーター配列及びその他の制御DNA配列、及び種々のタイプの宿主細胞が知られており、入手可能である。慣用のトランスフェクション技術、同じく慣用のDNAクローニング及びサブクローニング技術が本発明を実施するのに有用であり、当業者に知られている。種々のタイプのベクター、例えばプラスミド、動物ウイルスを含むウイルス及びバクテリオファージ等を使用することができる。クローンのファミリーのうちどれがベクターの組換え体DNAをうまく組み込んだかを同定するために使用できる検出可能な発現型特性を、うまくトランスフェクトされた細胞に与える種々のマーカー遺伝子をベクターに挿入することができる。

有用であり得るストレスタンパク質をコードするDNA分子は種々の方法により得ることができる。対象となる遺伝子は、標準的なcDNAライブラリーから、コロニーまたはブラックハイブリダイゼーション法、あるいはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用して精製することができ、これらの方法は全て当分野で周知である。例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition” Sambrookら(1989), Cold Spring Harbor Pressを参照されたい(この開示内容を参考としてここに組み入れる)。あるいは、好適な遺伝子は、慣用の自動ポリヌクレオチド合成機で製造した合成オリゴヌクレオチドを適当なリガーゼで連結して組み立てることによっても生成することができる。例えば、15塩基を含むオーバーラップする相補的DNAフラグメントを、末端部分を非リン酸化状態にして連結中

の重合を防ぎながら、ホスホルアミダイト化学を使用して半手作業的に合成する

ことができる。合成DNAの一端が特定の制限エンドヌクレアーゼの作用部位に対応する「付着末端」となるようにし、他端が別の制限エンドヌクレアーゼの作用部位に対応する末端となるようにする。あるいは、この方法は完全に自動化することもできる。生合成構築物をコードするDNAは、例えばApplied Biosystemsオリゴヌクレオチド合成機でより長い単鎖フラグメント(例えば50~100ヌクレオチド長)を合成し、そのフラグメントを連結することにより形成することができる。

組換え体DNA構築物は、次いで発現ベクター中に組み込み、タンパク質発現のための適当な宿主細胞中にトランスフェクトすることができる。有用な宿主細胞としては、大腸菌、酵母(Saccharomyces)、昆虫/バキュロウイルス細胞系、骨髄腫細胞、その他の種々の哺乳動物細胞等が挙げられる。大腸菌及びその他の微生物宿主においては、合成遺伝子を融合タンパク質として発現させることができる。真核細胞中での発現は、対象の生合成タンパク質をコードするDNA配列を骨髄腫あるいはその他のタイプの細胞系にトランスフェクトすることにより得られる。

ベクターはさらに、組換え体タンパク質の正確な発現を促進する種々の配列を含むことができ、それらは転写プロモーター及び終結配列、エンハンサー配列、好ましいリボソーム結合部位配列、好ましいmRNAリーダー配列、好ましいタンパク質プロセッシング配列、タンパク質分泌のための好ましいシグナル配列等である。対象となる遺伝子をコードするDNA配列をさらに操作して、阻害する可能性のある配列を除去し、あるいは望ましくない二次構造の形成を最小限にすることもできる。組換え体タンパク質は融合タンパク質としても発現させることができる。翻訳後、タンパク質を細胞自体から精製するか、培養培地から回収することができる。

例えば、遺伝子を大腸菌中で発現させようとする場合には、遺伝子をまず発現ベクター中にクローン化すればよい。これは、作製した遺伝子を、例えばTrpあるいはTacのようなプロモーター配列、及びタンパク質AのフラグメントB(FB)のようなリーダーペプチドをコードする遺伝子の下流に位置させることにより行

うことができる。得られる融合タンパク質は細胞の細胞質中の光屈折小体(refractive body)中に蓄積され、フレンチプレスあるいは超音波処理により細胞を破壊した後に回収することができる。光屈折小体を可溶化し、多くの他の組換え体タンパク質について既に確立された方法により発現タンパク質を再生し、開裂する。

真核細胞中での操作遺伝子の発現のためには、トランスフェクションが容易で、再構成されていない配列の外来DNAを安定に維持することができ、効率的な転写、翻訳、翻訳後修飾及びタンパク質分泌のために必要な細胞成分を有する適当な細胞及び細胞系を確立する必要がある。さらに、対象の遺伝子を担う適当なベクターも必要である。哺乳動物細胞へのトランスフェクションのためのDNAベクターの設計には、上記したような対象の遺伝子の発現を促進する適当な配列、例えば適当な転写開始、終結及びエンハンサー配列、並びに転写効率を増強する配列、例えばKozakコンセンサス配列等を含めるべきである。DNAベクターはマーカー遺伝子及び対象の遺伝子のコピー数を増幅する手段も含むことが好ましい。有用な細胞、タンパク質発現促進配列、マーカー遺伝子及び遺伝子増幅法等を含む、哺乳動物細胞中での外来タンパク質の生産の最新技術についての詳細な説明は Genetic Engineering 7:91-127 (1988) に開示されている。

特定の哺乳動物細胞中で外来遺伝子を発現させるのに有用な転写プロモーターのうち最もよく特性付けされたものはSV40初期プロモーター、アデノウイルスプロモーター(AdMLP)、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター(mMT-I)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)LTR(long terminal repeat)、マウス乳癌ウイルスLTR(MMTV-LTR)、及びヒトサイトメガロウイルス主要中間-初期プロモーター(hCMV)である。これらのプロモーターのDNA配列については全て当分野で知られており、市販品として入手できる。

dhfr細胞系における選択可能なDHFR遺伝子の使用は、哺乳動物細胞系中での遺伝子増幅に有用な、よく特性化された方法である。簡単に記載すると、対象の遺伝子を担うベクターにDHFR遺伝子を与え、次第に増加する濃度の細胞毒性薬剤メトトレキセートを添加すると、DHFR遺伝子のコピー数並びに結合された対象の遺伝子が増幅される。トランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣細胞系

(CHO細胞) 中の選択可能で増幅可能なマーカー遺伝子としてのDHFRは、当分野で特によく特性付けされている。その他の有用な増幅可能なマーカー遺伝子としてはアデノシンデアミナーゼ(ADA) 遺伝子、グルタミンシンターゼ(GS) 遺伝子等がある。

細胞/細胞系の選択も重要であり、実験者の要請にも依る。サル腎臓細胞(COS) は、高いレベルの一時的な遺伝子発現を与え、ベクターの構築とクローン化遺伝子の発現を迅速に試験するための有用な手段となる。COS細胞を、対象の遺伝子を担うシミアンウイルス40(SV40)ベクターでトランスフェクトする。トランスフェクトされたCOS細胞は最終的には死滅し、所望のタンパク質産物の長期生産が妨げられる。しかし、一時的な発現では、安定な細胞系の開発に必要な時間のかかる工程を要しない。確立された細胞系のなかでは、CHO細胞がこれまで最もよく特性付けされている。CHO細胞は広い範囲の細胞型からのタンパク質の発現を可能にする。CHO細胞の一般的な適用可能性と、無関係の細胞型において種々のヒトタンパク質を成功裏に生成できることは、全ての哺乳動物細胞の根底にある類似性を強く示すものである。

本発明の組換え体ストレスタンパク質構築物の哺乳動物細胞発現に使用できる種々の細胞、細胞系及びDNA配列は当分野でよく特性付けされており、容易に入手できる。その他のプロモーター、選択マーカー、遺伝子増幅方法、及び細胞も本発明のタンパク質を発現させるために使用できる。トランスフェクション、発現、及び組換え体タンパク質の精製についての詳細は当分野の文献に十分記載されており、当業者の理解するところである。さらに哺乳動物細胞発現系中での外来遺伝子の生産において使用される各段階の種々の技術的側面についての詳細は、当分野の多くのテキストや実験室マニュアル、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (1989) Ausubelら編, Wiley Interscience等に見られる。

IV. 免疫原性をもちうるペプチドの単離

先に記載したように、免疫原性をもちうるペプチドは、ストレスタンパク質-ペプチド複合体またはMHC-ペプチド複合体から単離できる。これらの複合体からペプチドを単離するプロトコルを以下に記載する。

(a) ストレスタンパク質-ペプチド複合体からのペプチド

ストレスタンパク質-ペプチド複合体からペプチドを溶離するためには2つの方法を使用できる。1つの方法はストレスタンパク質-ペプチド複合体をATPの存在下でインキュベートするものであり、もう1つは該複合体を低pH緩衝液中でインキュベートするものである。

簡単に記載すると、まず対象の複合体をCentricon 10アセンブリー(Millipore)を通して遠心分離して、複合体にゆるく結合している低分子量物質を全て除去する。高分子量フラクションは取り出してSDS-PAGEにより分析することができ、一方低分子量のものは下記のようにHPLCで分析することができる。ATPインキュベーション法においては、高分子量フラクション中のストレスタンパク質-ペプチド複合体を10mM ATPと30分間室温でインキュベートする。低pH法においては、ストレスタンパク質-ペプチド複合体に酢酸を加えて10%(v/v)の最終濃度とし、この混合物を沸騰水浴中で10分間インキュベートする。例えば、Van Bleekら(1990) *Nature* 348:213-216; 及びLiら(1993) *EMBO Journal* 12:3143-3151を参照されたい(これらの文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。

得られる試料を前記のようにCentricon 10アセンブリーを通して遠心分離する。高分子量及び低分子量フラクションを回収する。残った高分子量ストレスタンパク質-ペプチド複合体をATPとあるいは低pHで再インキュベートして残留ペプチドを分離することができる。

得られる低分子量フラクションをプールし、蒸発させて濃縮し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中に溶解する。その後溶解した物質を、例えば0.1%TFAにより平衡化したVYDAC C18逆相カラムを使用して、逆相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により分画化する。次に0.1%TFA中の0~80%アセトニトリル直線勾配により約0.8ml/分の流速でカラムを展開して結合物質を溶出する。ペプチドの溶出はOD₂₁₀によりモニターすることができ、ペプチドを含むフラクションを回収する。

(b) MHC-ペプチド複合体からのペプチド

MHC分子からの免疫原性をもちうるペプチドの単離は周知であるのでここでは詳細に記載しない。例えば、Falkら(1990) *Nature* 348:248-251; Rotzscheら(

1990) Nature 348:252-254; Elliottら (1990) Nature 348:195-197; Falkら (1991) Nature 351:290-296; Demetzら (1989) Nature 343:682-684; Rotzscheら (1990) Science 249:283-287を参照されたい。

簡単に記載すると、まずMHC-ペプチド複合体を慣用のイムノアフィニティ法により単離する。その後MHC-ペプチド複合体をアセトニトリル中の約0.1% TFAの存在下でインキュベートすることにより、ペプチドを複合体から溶離する。抽出されたペプチドは前述のように逆相HPLCにより分画化し精製することができる。

溶離されたペプチドのアミノ酸配列は、手作業により、あるいは当分野で周知の自動化されたアミノ酸配列解析法により決定できる。防御ペプチドである可能性のあるペプチドのアミノ酸配列が決定されたら、慣用のペプチド合成あるいは当分野で周知のその他のプロトコールを使用して所望の量のそのペプチドを合成することができる。

V. 有効でありうる免疫原性ペプチドの合成

上記で単離されたものと同じアミノ酸配列を有するペプチドは、Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149により記載されたものと同様の方法を使用して固相ペプチド合成により合成できる。合成の間、側鎖を保護したN- α -保護アミノ酸を順次加えて、そのC-末端が不溶性のポリマー支持体、即ちポリスチレンビーズに結合されたポリペプチド鎖を成長させる。N- α -脱保護アミノ酸のアミノ基を、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドのような試薬と反応させて活性化させたN- α -保護アミノ酸の α -カルボキシ基と結合させることによりペプチドを合成する。遊離のアミノ基を活性化カルボキシルに結合させることによりペプチド結合が形成される。最も普通に用いられる保護基としては、酸に対して不安定なBoc、塩基に対して不安定なFmoc等がある。

簡単に記載すると、まずC-末端N- α -保護アミノ酸をポリスチレンビーズに結合させる。その後N- α -保護基を除去する。脱保護された α -アミノ基を次のN- α -保護アミノ酸の活性化された α -カルボキシレート基に結合させる。所望の

ペプチドが合成されるまでこの工程を繰り返す。次に得られたペプチドを不溶性のポリマー支持体から切断し、アミノ酸側鎖を脱保護する。保護ペプチドフラグ

メントを縮合させることにより、より長いペプチドを誘導することができる。適当な化学反応、樹脂、保護基、保護アミノ酸及び試薬の詳細は当分野で周知であり、ここでは詳述しない。例えば、Athertonら、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, (1989)及びBodanszky, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd Ed., Springer-Berlog (1993) を参照されたい(これ等の文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。

得られたペプチドの精製は慣用の方法、例えばゲル透過、分配及び／またはイオン交換クロマトグラフィーを使用する分取HPLCにより行うことができる。適当なマトリックス及び緩衝液の選択は当分野で周知であり、ここでは詳述しない。

VI. ストレスタンパク質-ペプチド複合体の再構成

当業者には理解されるように、前記で挙げた方法を使用して複合体から単離されたか、あるいは化学的に合成されたペプチドを、種々の天然から精製されたあるいは組換え体であるストレスタンパク質とin vitroで再構成させて免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体を生成することができる。ストレスタンパク質とペプチドをin vitroで再構成するための好ましいプロトコールを以下に記載する。

再構成の前にストレスタンパク質をATPあるいは低pHで処理して、対象のストレスタンパク質に結合している可能性のあるペプチドを全て除去する。ATP法を使用する場合は、Levyら (1991) Cell 67:265-274に記載されたようにしてアピラナーゼを添加して調製物から過剰のATPを除去する(前記文献の開示内容を参考としてここに組み入れる)。低pH法を使用する場合は、pH調整剤を添加して緩衝液を中性pHに再調整する。

ペプチド(1mg)と前処理したストレスタンパク質(9mg)を混合して、約5ペプチド:1ストレスタンパク質のモル比を得る。次に、20mMリン酸ナトリウム、pH7.2、350mM NaCl、3mM MgCl₂及び1mM PMSFを含む結合緩衝液中で、混合物を室温で3時間インキュベートする。調製物をCentricon 10アセンブリー(Milli

pore)を通して遠心分離し、未結合のペプチドを全て除去する。ペプチドのストレスタンパク質との結合はSDS-PAGE、及び放射性標識されたペプチドを複合体の

再構成に使用した場合はラジオオートグラフィーによりアッセイできる。

再構成の後、候補の免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体を、例えば以下に記載するような混合リンパ球標的細胞アッセイ (MLTC) を使用して *in vitro* で試験することができる。可能性のある免疫原性構築物が単離されたら、以下に記載するような好ましい投与プロトコールと賦形剤を使用してそれらを動物モデルにおいてさらに特性付けすることができる。

VII. ストレスタンパク質-ペプチド複合体の免疫原性の決定

精製され再構成されたストレスタンパク質-ペプチド複合体は、当分野で周知の混合リンパ球標的培養アッセイ (MLTC) を使用して免疫原性についてアッセイすることができる。

簡単に記載すると、まず候補のストレスタンパク質-ペプチド複合体をマウスに皮下注射する。その他のマウスにはアッセイの陽性対照となるその他のストレスタンパク質-ペプチド複合体か、感染細胞の全体を注射する。マウスには7～10日の間隔で2回注射する。最後の免疫化の10日後に脾臓を摘出し、切除脾臓からリンパ球を取り出す。死滅する前に対象の複合体を発現していた死亡細胞を添加することにより、取り出したリンパ球を *in vitro* で再刺激してもよい。

例えば、10%ウシ胎児血清を含む3ml RPMI培地中の 4×10^4 のマイトマイシンC処理または γ -照射 (5～10,000 rad) 細胞 (細胞内病原体により感染されたか適当な遺伝子をトランスフェクトされた細胞) により 8×10^6 の免疫脾細胞を刺激することができる。いくつかの場合には、33%の二次混合リンパ球培養物上清をT細胞成長因子の供給源として培養培地に加えてもよい。例えば、Glasebrookら (1980) J. Exp. Med. 151:876を参照されたい。免疫後に一次細胞障害性T細胞応答を試験するために、脾細胞を刺激なしで培養することができる。また免疫化マウスの脾細胞を免疫原性の異なる細胞で再刺激して細胞障害性T細胞応答の特異性を判断する実験を行うこともできる。

6日後に培養物を4時間の⁵¹Cr-放出アッセイにおいて細胞障害性について試

験する。例えば、Palladinoら (1987) Cancer Res. 47:5074-5079及びBlachereら (1993) J. Immunotherapy 14:352-356を参照されたい (これ等の文献の開示

内容を参考としてここに組み入れる)。このアッセイにおいては、混合リンパ球培養物を標的細胞懸濁物に加えて種々のエフェクター:標的(E:T)比(通常1:1~40:1)を得る。標的細胞は、 1×10^6 の標的細胞を200mCi $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ を含む培養培地中で37℃で1時間インキュベートすることにより予備的に標識する。標識後、細胞を3回洗浄する。各アッセイポイント(E:T比)について3回の反復実験を行い、適当な対照を使用して自発的な ^{51}Cr 放出(リンパ球を加えずにアッセイする)を測定し、また100%放出(界面活性剤で溶解した細胞)を測定する。細胞混合物を4時間インキュベートした後、200gで5分間の遠心分離により細胞をペレット化する。上清に放出された ^{51}Cr の量をガンマカウンターで測定する。細胞障害パーセントを(試験試料中のcpm-自発的に放出されたcpm)/(界面活性剤により放出された全cpm-自発的に放出されたcpm)として測定する。

MHCクラスIカスケードをブロックするため、K-44ハイブリドーマ細胞(抗-MHCクラスIハイブリドーマ)から誘導された濃縮ハイブリドーマ上清を最終濃度が12.5%となるまで試験試料に加える。

VIII. 製剤およびワクチン接種方法

一旦ストレスタンパク質-ペプチド複合体の候補が同定されたならば、それらを動物モデルまたは意図されたレシピエントに投与し、予め選択した細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を刺激することができる。本発明のストレスタンパク質-ペプチド複合体は、生理学的に許容されるキャリアー、賦形剤、または安定剤と混合することにより保存することもできるし、または投与のため調製することもできる。これらの材料は、採用される投与量および濃度において意図されたレシピエントに対して無毒性でなければならない。

複合体が水溶性の場合は、適切な緩衝液、例えばリン酸緩衝化生理食塩水(5mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl, pH7.1)または他の生理学的に適合する溶液を用いて製剤化することができる。または、得られた複合体が水性溶剤にほとんど溶解しない場合、Tweenまたはポリエチレングリコール等の非イオン界面活性剤を用いて製剤化することができる。

経口または非経口投与に有用な溶液は、製薬技術において周知の、例えば Rem

ington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A. 編)、Mack Pub., 1990に記載の任意の方法により調製することができる。製剤は、例えばポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコール、植物由来の油、水素化ナフタレン、等を含むことができる。特に直接投与用の製剤は、グリセリンおよび他の粘性の高い組成物を含むことができる。例えばヒアルロン酸、コラーゲン、リン酸三カルシウム、ポリブチレート、ポリラクチド、ポリグリコリドおよびラクチド/グリコリドコポリマーを含む生体適合性の、好ましくは生体吸収性(bioresorbable)のポリマーは、ストレスタンパク質-ペプチド複合体のin vivo放出を制御する有用な賦形剤である。

吸入投与用の製剤は賦形剤として例えばラクトースを含むことができる。水溶液は例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸およびデオキシコール酸を含むことができる。油性溶液は点鼻薬として投与に有用でありうる。ゲルを局所的に鼻腔内に適用することができる。

ここに提供する化合物は、製薬的に許容される非毒性賦形剤およびキャリアーと混合することにより医薬組成物に製剤化することができる。さらに、これらの

化合物は場合により1つまたはそれ以上のアジュバントを含有することができる。好ましいアジュバントは以下のものを含むがそれらだけに限定されない。すなわち、プルロニックトリブロック(pluronic tri-block)コポリマー、ムラミルジペプチドおよびその誘導体、解毒したエンドトキシン、サポニンおよびその誘導体、例えばQS21、およびリポソームである。本発明はさらに、前記複合体を長期にわたって放出する持続性放出製剤を意図する。

本発明にしたがって調製されたストレスタンパク質-ペプチドワクチンのファミリーの投与量および投与手段は、複合体の性質、細胞内病原体、および問題となっている疾患の性質に必ず依存するであろう。複合体は、細胞内病原体に対する細胞障害性T細胞応答を開始させるのに十分な量を投与しなければならない。投与すべき薬剤の好ましい用量もまた、疾患の種類、意図されたレシピエントの年齢、性別および体重、特定患者の全般的健康状態、選択した化合物の相対的生物学的効率、化合物の剤形、剤形に使用されている賦形剤の有無および種類、お

よび投与経路、等の変動要因に依存するであろう。

一般的には、本発明の化合物は、非経口投与のために約0.001から10% w/vの化合物を含有する水性生理緩衝液の形で提供される。典型的な投与量は、1回の免疫感作につきレシピエントの体重1 kgあたり複合体約0.1から約1000マイクログラムの範囲である。そして好ましくは、1回の免疫感作につきレシピエントの体重1 kgあたり複合体約0.5から約100マイクログラムの範囲である。体重約75 kgのヒト被験者に、1回につき約10~250マイクログラムの複合体が投与されると考えられる。しかし、これらの量は複合体と同時に投与されるアジュバントによって変わりうる。

ワクチンは、以下のものを含むがそれらだけに限定されない標準的プロトコルを用いて投与することができる。すなわち、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、静脈内、腔内、直腸内、経口、舌下、経皮および鼻腔内投与である。好ましくは、レシピエントは一週間の間隔において4回ワクチンを接種される。必要であれば、後にさらにワクチン投与をおこなって応答を促進することができる。最適用量およびワクチン接種計画は、当分野の技術で周知の技法を用いて、各ストレスタンパク質-ペプチドワクチンについて経験的に決定しうると考えられる。

ストレスタンパク質複合体と共に、種々のサイトカイン、抗生物質、および他の生体活性作用物質も投与することができる。生理的応答を最大限にするために、例えば、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TNF β 、G-CSF、GM-CSFおよびTGF- β 等の種々の公知サイトカインを前記複合体と共に同時投与することができる。しかし、他の、まだ発見されていないサイトカインが本発明に有効であることが予想される。さらに、従来の抗生物質をストレスタンパク質-ペプチド複合体と共に同時投与することができる。適切な抗生物質の選択もまた、問題となっている疾患に依存する。

実施例1. 抗原決定基をコードする遺伝子を用いてトランスフェクトした細胞から単離したストレスタンパク質-ペプチド複合体の免疫原性

図1は、PR8インフルエンザウイルス由来の核タンパク質(NP)遺伝子を用

いてトランスフェクトしたBALB/c繊維芽細胞より採取したgp96-ペプチド複合体を用いて免疫感作したマウス由来の脾細胞の抗原特異的細胞障害性T細胞活性を示す。

簡単に述べると、PR8インフルエンザウイルスのNP遺伝子を用いてトランスフェクトされ、それを発現しているBALB/c細胞より、gp96-ペプチド調製物を単離した。gp96-ペプチド複合体は、非修飾gp60-ペプチド複合体精製プロトコールによって、100,000g上清から単離した。次に、調製物を用いてまだ実験に使われていないBALB/cマウスを免疫感作した。10日の間隔をおいてマウスにgp96-ペプチド複合体を2回皮下注射した。マウスを屠殺し、脾細胞を得た。前述の混合標的リンパ球培養(MLTC)アッセイを用いて、致死的に照射された、NP遺伝子を発現しているBALB/c細胞を添加することにより上記脾細胞を2回 *in vitro* で刺激した。6日後に、⁵¹Cr放出アッセイを用いて、培養物を細胞障害性について試験した。MHCタイプIカスケードをブロックするため、脾細胞をK-44ハイブリドマ(抗MHCタイプIイムノグロブリン含有)培養物由来の上清と共にインキュベートした。

NP遺伝子を発現しているBALB/c繊維芽細胞(黒丸)、NP遺伝子を発現しているが抗MHCタイプI抗血清で処理されているBALB/c細胞(白丸)、および同遺伝子型の、NPでトランスフェクトされていない細胞系5117(星印)からの⁵¹Cr放出により細胞障害性活性をアッセイした。gp96複合体を用いて免疫感作したマウスの脾臓は、NP遺伝子を発現しているBALB/c細胞に対して強い、MHCクラスIに限定された細胞障害性T細胞活性を示したが、同遺伝子型の、NPでトランスフェクトされていない細胞系5117に対しては示さなかった。さらに、抗MHCタイプI抗血清は上記の応答をブロックした。したがって、ストレスタンパク質-ペプチド複合体を用いた免疫感作は、複合体中のペプチドに対する特定の細胞障害性T細胞応答を引き出すこと、およびMHCクラスIカスケードは細胞内病原体に感染した細胞に対する細胞障害性T細胞応答を刺激する際に不可欠の役割を果たすこと、が明らかである。

実施例2. SV40で形質転換した細胞から単離したストレスタンパク質-ペプチド

複合体の免疫原性

図2は、SV40で形質転換したSVB6細胞から採取したgp96-ペプチド複合体を用いて免疫感作したマウス由来の脾細胞の抗原特異的細胞障害性T細胞活性を示す。

簡単に述べると、SV40で形質転換したSVB6細胞からgp96-ペプチド複合体を単離し、これを用いてまだ実験に使われていないマウス(57BL/6)を免疫感作した。gp96-ペプチド複合体は、非修飾gp60-ペプチド複合体精製プロトコールによって、100,000g上清から単離した。10日の間隔においてマウスにこの複合体を2回皮下注射した。マウスを屠殺し、脾細胞を単離し、MLTC法により致死的に照射されたSV40形質転換SVB6細胞を添加することによりこれら脾細胞をin vitroで刺激した。6日後に、⁵¹Cr放出アッセイを用いて、培養物を細胞障害性について試験した。SVB6細胞(黒三角)およびSV40でトランスフェクトしていない、同遺伝子型の細胞系MCA(白三角)からの⁵¹Cr放出により細胞障害性活性をアッセイした。また、K-44ハイブリドーマ細胞系由来の抗MHCクラスIイムノグロブリンを脾細胞に添加することにより、MHCクラスI媒介活性もアッセイした。

gp96-ペプチド複合体を用いて免疫感作したマウスの脾細胞は、SV40でトランスフェクトされたSVB6細胞に対して強い、MHCクラスIに限定された活性を示したが、トランスフェクトされていない細胞に対しては示さなかった。

実施例3. 免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体のin vitro再構成

図3A～3Dは、再構成されたHsp70-ペプチド複合体を用いて免疫感作した2匹のマウス由来の脾細胞の抗原特異的細胞障害性T細胞活性を示す。

簡単に述べると、複合体化していないHsp70を上記の方法で精製し、ペプチド(SLSDLRGVYQGL, 配列番号1)を固相ペプチド合成法により合成した。このペプチド(1mg)およびATPで処理したHsp70(9mg)を混合し、20mMリン酸ナトリウム、pH 7.2, 350mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1mM PMSFを含有する結合緩衝液中で、室温で3時間インキュベートした。得られた調製物をCentricon 10アセンブリ(Millipore)を通して遠心し、未結合ペプチドを除去した。

得られた複合体を用いて2匹のまだ実験に使われていないマウスを免疫感作し

た。マウスから脾細胞を単離し、MLTC法を用いて、致死的に照射された、ペプチド SLSDLRGYVYQGL (配列番号1) をコードするミニ遺伝子によってトランスフェクトされ、この遺伝子を発現しているEL4細胞を脾細胞に添加することにより *in vitro* で2回刺激した。両マウス由来の脾細胞の細胞障害性を、最初の刺激後 (3Aおよび3C) および2回目の刺激後 (3Bおよび3D)、⁵¹Cr 放出アッセイによりアッセイした。EL4細胞 (白三角) およびペプチド SLSDLRGYVYQGL (配列番号1) によってトランスフェクトされ、これを発現しているEL4細胞 (黒三角) からの⁵¹Cr の放出を測定した。その結果は、ストレスタンパク質およびペプチドは *in vitro* で上首尾に再構成され、特定の免疫原性ストレスタンパク質-ペプチド複合体をもたらすことを示している。

本発明は、本発明の精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化することが可能である。それゆえ、現在の態様は全ての点で説明的なもので本発明を限定するものではないことが理解されねばならない。そして、本発明の範囲はこれまでの記述ではなく、請求の範囲によって示される。したが

って、請求の範囲と等しい意味および範囲内に含まれる全ての変更は、請求の範囲に含まれるものと見做す。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

特徴を表す記号：Peptide

存在位置：1..13

他の情報：/label=PEPTIDE 1

/note="ANTIGENIC PEPTIDE 1"

配列

Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Gly	Tyr	Val	Tyr	Gln	Gly	Leu
1				5					10			

【図1】

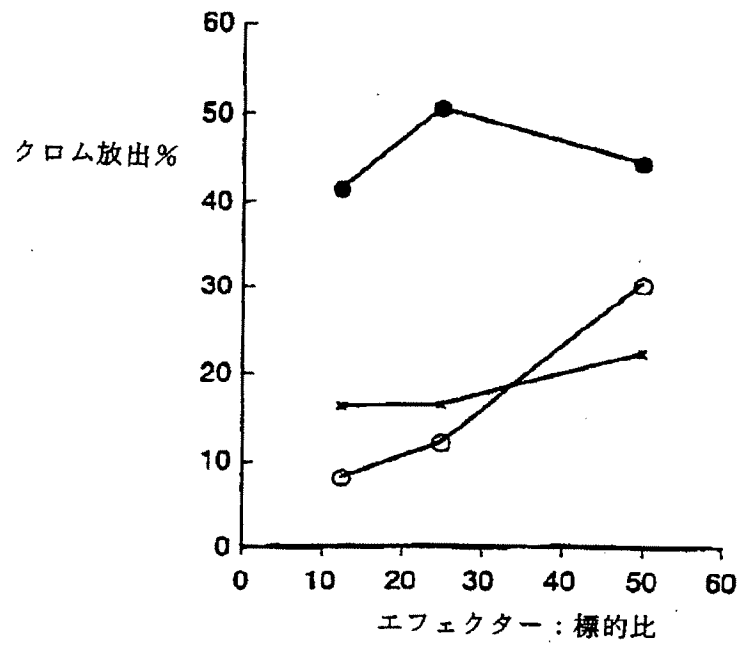


FIG. 1

【図2】

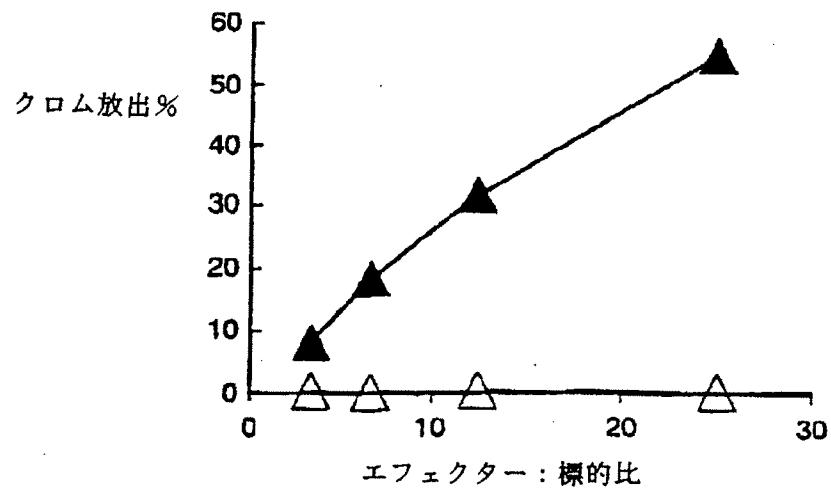


FIG. 2

【図3】

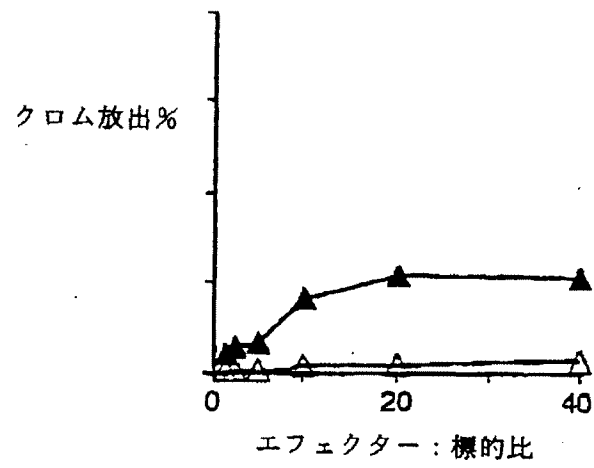


FIG. 3A

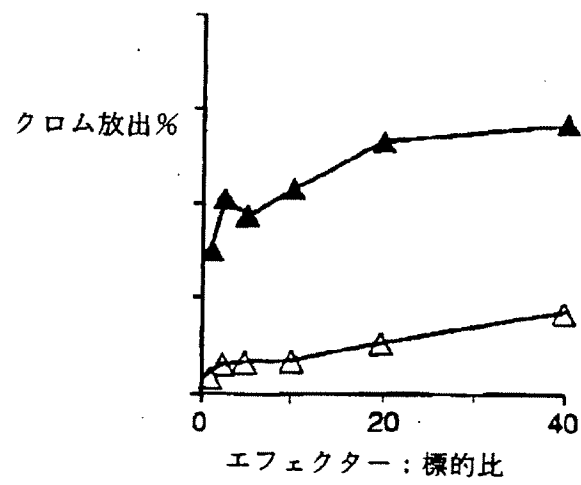


FIG. 3B

【図3】

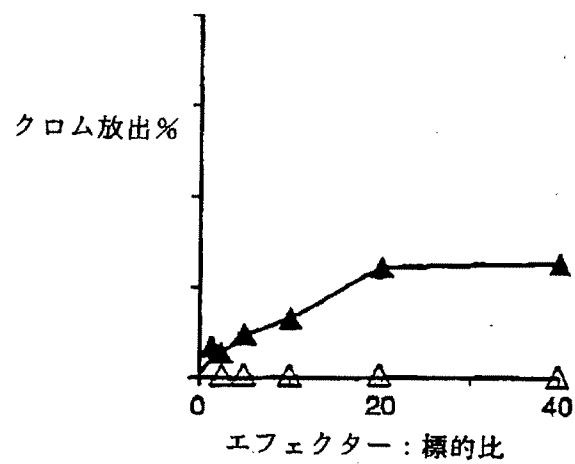


FIG. 3C

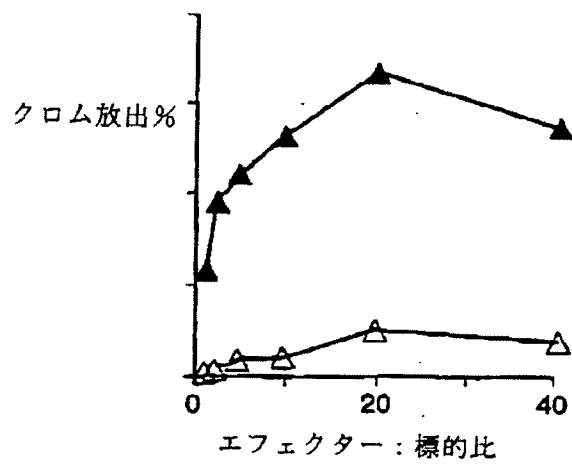


FIG. 3D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/002 A61K39/02 A61K39/118 A61K39/12 A61K39/295 C07K17/00		International Application No. PCT/US 95/03311
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims No.
X	EUR. J. IMMUNOL., vol. 22, 1992 pages 1365-1372, C. BARRIOS ET AL. 'Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guérin priming.' see page 1365, paragraph 1 - page 1366 see page 1366, paragraph 2.2 see page 1370, paragraph 4	1-3, 11, 12, 17
Y	Discussion, first and second paragraphs --- -/--	4-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 July 1995		Date of mailing of the international search report 29.08.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Halle, F

Form PCT/ISA/216 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 95/03311

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 December 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 271089a, SRIVASTAVA P.K. AND UDONO H. 'Heat-shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy.' page 12;	1-3
Y	see abstract & CURR. OPIN. IMMUNOL., vol. 6, no. 5, 1994 pages 728-732.	4-36
X,P	WO-A-94 29459 (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 22 December 1994 see the whole document	1-3
Y	WO-A-94 03208 (YEDA RES & DEV ; COHEN IRUN R (IL); FRIDKIN MATITYAHU (IL); KONEN W) 17 February 1994 see page 7, line 17 - page 8, line 32 see claims 1-5, 20-25	4-36
A	WO-A-93 18146 (INST NAT SANTE RECH MED) 16 September 1993 see the whole document	1-3
A	EXPERIENTIA, vol. 50, 1994 pages 1054-1060, P. K. SRIVASTAVA 'Heat shock proteins in immune response to cancer: The Fourth Paradigm.'	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US95/03311

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18-30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 18-30 are directed to a method of treatment of the human or animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/US 95/03311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9429459	22-12-94	NONE	
WO-A-9403208	17-02-94	AU-B- 4790093	03-03-94
		CA-A- 2141454	17-02-94
		EP-A- 0658120	21-06-95
		FI-A- 950405	30-03-95
		NO-A- 950328	23-03-95
WO-A-9318146	16-09-93	FR-A- 2688227	10-09-93

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1993)

 フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 39/295		9455-4C	A 6 1 K 39/295
C 0 7 K 14/47		9356-4H	C 0 7 K 14/47
	14/52	9356-4H	14/52
(72) 発明者 鶴殿 平一郎			
岡山県 岡山市 津島中 1-2-アール			
エフ303			
(72) 発明者 ブラシエア, ナタリー イー.			
アメリカ合衆国 10028 ニューヨーク州			
ニューヨーク, イースト 86ディーエイ			
チ ストリート 510番地 アパートメン			
ト 18ディー			